

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-531325

(P2005-531325A)

(43) 公表日 平成17年10月20日(2005.10.20)

(51) Int.Cl.⁷**A23C 7/00****A23C 9/00****A23L 1/30**

F 1

A 23 C 7/00

A 23 C 9/00

A 23 L 1/30

テーマコード(参考)

4 B 001

4 B 018

A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2004-519389 (P2004-519389)
 (86) (22) 出願日 平成15年7月3日 (2003.7.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年3月4日 (2005.3.4)
 (86) 國際出願番号 PCT/NZ2003/000140
 (87) 國際公開番号 WO2004/004450
 (87) 國際公開日 平成16年1月15日 (2004.1.15)
 (31) 優先権主張番号 NZ520016
 (32) 優先日 平成14年7月3日 (2002.7.3)
 (33) 優先権主張国 ニュージーランド (NZ)

(71) 出願人 504434028
 エイツー・コーポレーション・リミテッド
 ニュージーランド国ドゥネディン, モーレ
 イ・プレース 475, オタゴ・ハウス,
 レベル 10, シー・エディンバラ・トラ
 スト
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 杜本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠式
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】生乳の脂肪酸の組成を変える方法

(57) 【要約】

生乳中の不飽和脂肪酸のレベルとの関連において飽和脂肪酸のレベルを低減する方法。特にメスウシの生乳中に産生される - カゼインの 67 番の位置にあるアミノ酸残基に基づいて、メスウシの遺伝子型および/または表現型を決定すること。本発明は、生乳中の飽和脂肪酸 - 対 - 不飽和脂肪酸の比率、および生乳中の - カゼイン変異型との間に相関がある、との所見に基づく。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の方法：すなわち

(a) ある集団が、67番の位置にプロリンを有する - カゼインを含有する生乳を產生するメスウシ、および67番の位置にヒスチジンを有する - カゼインを含有する生乳を產生するメスウシを包含する場合において、67番の位置にプロリン残基を有する - カゼインをコードするDNAの存在について、該集団の各メスウシの遺伝子の素材を検査することにより、または67番の位置にプロリンを有する - カゼインの存在について、該集団の各メスウシにより產生される生乳（またはその生乳から製造される製品）を検査することにより、該集団のどのメスウシが67番の位置にプロリンを有する - カゼインを含有する生乳を產生するのかを決定すること；

(b) 67番の位置にプロリン残基を有する - カゼインをコードするDNAを有するメスウシ、または67番の位置にプロリンを有する - カゼインを含有する生乳を產生するメスウシ、を選択すること；および

(c) 選択されたメスウシから搾乳し、該集団から得られる生乳と比較して、不飽和脂肪酸のレベルとの関連においてレベルの低減した飽和脂肪酸を有する生乳を得ること；によりウシの生乳において、不飽和脂肪酸のレベルとの関連において飽和脂肪酸のレベルを低減する方法。

【請求項 2】

67番の位置にプロリンを有する - カゼインが、 - カゼインA²、A³、D、EおよびFの1つまたはそれより多くを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

67番の位置にプロリンを有する - カゼインが - カゼインA²である、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

67番の位置にヒスチジンを有する - カゼインが、 - カゼインA¹、BおよびCの1つまたはそれより多くを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

67番の位置にヒスチジンを有する - カゼインが、 - カゼインA¹である、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

集団から得られる生乳と比較して、各炭素鎖中に6から14の炭素原子を有する短鎖および中鎖の飽和脂肪酸（C6：0 - C14：0）のレベルを低減する、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

集団のどのメスウシが67番の位置にプロリンを有する - カゼインを含有する生乳を產生するかの決定が、67番の位置にプロリン残基を有する - カゼインをコードするDNAの存在について、メスウシの遺伝子の素材を検査することによる、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

集団のどのメスウシが67番の位置にプロリンを有する - カゼインを含有する生乳を產生するかの決定が、67番の位置にプロリンを有する - カゼインの存在について、メスウシにより產生される生乳（またはその生乳から製造される製品）を検査することによる、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

メスウシの遺伝子の素材が、有核細胞を含有する、または含有していたいとなる組織でもよい、請求項1から8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

遺伝子の素材を血液、体毛、または生乳から得る、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法により得られる生乳。

【請求項 1 2】

請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法により得られる生乳から調製される乳製品。

【請求項 1 3】

食品に、67番の位置にプロリンを有する一定量の - カゼインを加えることにより、該食品中の飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸の比率を変える方法。

【請求項 1 4】

飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸の比率を、食品中の飽和脂肪酸のレベルを低減することにより変える、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

食品が生乳または生乳から調製された乳製品である、請求項 1 3 または請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 から 10 のいずれか 1 項の方法により得られる生乳（または生乳からの抽出物）を加えることにより、67番の位置にプロリンを有する - カゼインを食品に加える、請求項 1 3 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（技術分野）

本発明は生乳において、不飽和脂肪酸のレベルとの関連において飽和脂肪酸のレベルを低減する方法に関する。特に本発明はメスウシの生乳中に產生される - カゼインの 67 番に位置するアミノ酸残基に基づいて、メスウシの遺伝子型および/または表現型を決定することに関する。

【背景技術】

【0002】

（背景）

食事からの飽和脂肪酸摂取は、特に母集団の栄養状態のよい国々において、ヒトの心疾患の主要なリスク因子であることが知られている。動物製品、例えば乳製品（特に生乳）が、ヒトの食事からの摂取に主に寄与している。生乳中に見出される飽和脂肪酸、特に 18 より少ない炭素原子の鎖をもつ飽和脂肪酸のレベルが、冠動脈心疾患の 1 つのリスク因子であることは一般に認められている。反対に、不飽和脂肪酸は有益であると考えられている。このため、動物ベースの製品とは反対に植物由来の油の消費がより好まれてきた。

【0003】

医学界でも、アテローム発生性であると考えられている飽和脂肪酸 C : 14 : 0 が多量に存在することから、生乳中に見出される脂肪の消費が懸念されている。乳製品製造業は、化学的分離および抽出技術を用いての、“低脂肪”牛乳という代替品の製造することで、部分的には答えてきた。

【0004】

脂肪に加えて、 - カゼインタンパク質の A¹変異型を含む生乳中の特定のタンパク質成分も、健康のリスク因子である。ヒトによる - カゼインタンパク質の A¹の消費が、ある種の疾患、特に糖尿病 (Elliot et al. 1999 Diabetologia 42: 292-6; Wasmuth et al. 1999 Diabetologia 42 (Suppl.1): A88 Proceedings of the Kongress der Europaischen Diabetesgesellschaft vom 28. -30.09.1999 in Brussels/Belgium) および冠動脈心疾患 (McLachlan, C.N., Med. Hypotheses 56(2): 262-72, 2001) のより高い発症率にリンクするといういくつかの報告がある。

メスウシの生乳中に產生される特定の - カゼイン変異型（1つまたは複数）を同定することにより、同メスウシの表現型を決定することに加えて、特異的な一塩基多型（SNP）について遺伝子型を決定して、メスウシがその生乳中にどの - カゼイン変異型（1つ

10

20

30

40

50

または複数)を産生するかを決定することができることはよく知られている。この遺伝子型を決定する方法に基づいてメスウシを選択し、-カゼインA¹変異型を含まない、そして好ましくは-カゼインA²変異型のみを含む生乳を産生する搾乳用の集団を得る方法は、PCT/NZ96/00039(WO 96/36239として公開されている)の主題である。

【0005】

出願者は今回、生乳中の飽和脂肪酸-対-不飽和脂肪酸の比率、および生乳中の-カゼイン変異型との間に相関があることを発見した。動物製品の脂肪酸の組成を変える公知の方法はあるが、これらの方法は典型的には化学的抽出、特定の食餌および管理システム、ならびに生乳中の特異的な脂肪酸のレベルに関する定量的な遺伝子の選択を含む。いずれの方法もコストを要し、一般に非効率的である。10

【0006】

したがって、不飽和脂肪酸との関連においてレベルの低減した飽和脂肪酸を有する生乳、もしくはその生乳から得られる製品を提供すること、または少なくとも有用な代替品を一般消費者に提供することが、本発明の1つの目的である。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の提示)

本発明の第1の側面において、ウシの生乳における不飽和脂肪酸のレベルとの関連において飽和脂肪酸のレベルを低減する方法を以下により提供する：20

(a) ある集団が、67番の位置にプロリンを有する-カゼインを含有する生乳を產生するメスウシ、および67番の位置にヒスチジンを有する-カゼインを含有する生乳を產生するメスウシを包含する場合において、67番の位置にプロリン残基を有する-カゼインをコードするDNAの存在について、該集団の各メスウシの遺伝子の素材を検査することにより、または67番の位置にプロリンを有する-カゼインの存在について、該集団の各メスウシにより產生される生乳(またはその生乳から製造される製品)を検査することにより、該集団のどのメスウシが67番の位置にプロリンを有する-カゼインを含有する生乳を產生するのかを決定すること；

(b) 67番の位置にプロリン残基を有する-カゼインをコードするDNAを有するメスウシ、または67番の位置にプロリンを有する-カゼインを含有する生乳を產生するメスウシを選択すること；および30

(c) 選択されたメスウシから搾乳し、該集団から得られる生乳と比較して、不飽和脂肪酸のレベルとの関連においてレベルの低減した飽和脂肪酸を有する生乳を得ること。

【0008】

67番の位置にプロリンを有する-カゼインは、-カゼインA²、A³、D、EおよびFの1つまたはそれより多くを含むことが好ましい。67番の位置にヒスチジンを有する-カゼインは、-カゼインA¹、BおよびCの1つまたはそれより多くを含むこともまた好ましい。

【0009】

本発明の好ましい態様において、67番の位置にプロリンを有する-カゼインは-カゼインA²であり、67番の位置にヒスチジンを有する-カゼインは-カゼインA¹である。40

【0010】

メスウシの該集団により產生される生乳において、不飽和脂肪酸のレベルとの関連において飽和脂肪酸のレベルを低減することに加えて、各炭素鎖中に6から14の炭素原子を有する短鎖および中鎖の飽和脂肪酸(C6:0-C14:0)のレベルもまた低減することは、さらによい。

【0011】

本発明のさらに好ましい態様において、該集団のどのメスウシが67番の位置にプロリ50

ンを有する - カゼインを含有する生乳を產生するかの決定は、67番の位置にプロリン残基を有する - カゼインをコードするDNAの存在についてメスウシの遺伝子の素材を検査することによる。これに代わる態様において、該集団のどのメスウシが67番の位置にプロリンを有する - カゼインを含有する生乳を產生するかの決定は、67番の位置にプロリンを有する - カゼインの存在についてメスウシにより產生される生乳（またはその生乳から製造される製品）を検査することによる。

【0012】

メスウシの遺伝子の素材は有核細胞を含有する、または含有していきかなる組織でもよいが、遺伝子の素材は好ましくは血液、体毛、または生乳から得る。

本発明の第2の側面において、本発明の第1の側面の方法により得られる生乳を提供する。

【0013】

本発明の第3の側面において、本発明の第1の側面の方法により得られる生乳から調製される乳製品を提供する。

本発明の第4の側面において、67番の位置にプロリンを有する一定量の - カゼインを食品に加えることにより、該食品中の飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸の比率を変える方法を提供する。

【0014】

好ましくは飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸の比率は、該食品中の飽和脂肪酸のレベルを低減することにより変える。

好ましくは該食品は、生乳または生乳から調製される乳製品である。本発明の第1の側面の方法により得られる生乳（または生乳からの抽出物）を加えることにより、67番の位置にプロリンを有する - カゼインを該食品に加えることもまた好ましい。

【0015】

（発明の詳細な説明）

動物の遺伝的性質が、生産レベルおよび製品の品質、ならびに健康、環境、および動物の福祉の問題に、かなりの影響を及ぼすことはよく知られている。遺伝子検査を用いて動物の表現型を決定する能力は、有益な特徴を持つ動物および動物の製品の迅速な同定を達成するための、そして強化された生産および/または製品の品質を有する動物の群を形成するための、有益な手段である。経済的利益のある動物または動物の製品の特徴に関連する遺伝的差異に基づいて、動物を分類することができる。

【0016】

動物の特定の身体的特徴の原因となる遺伝子（またはその遺伝子の変異型）は、一部の場合には、一塩基多型（SNP）により同定可能としてよい。SNPは、ある動物のゲノム中のある位置の1つのDNA配列が、たった1つのスクレオチドのために別の動物のゲノム中の同位置のDNA配列とは異なっているDNA配列である。これと同じような小さな差異であっても、1頭の動物が特定の身体的特徴を示すのに対して、別の動物はそれを示さないことを意味し得る。

【0017】

生乳のカゼイン含有量と脂肪含有量との間の関連性が同定されたが、これらはその相関のサイズおよび方向付けにおいて一定しなかった。したがってこの結果は決定的とはいえない。Bovenhuis および Weller (Genetics; 137(10): 267-80, 1994)は、この関連性はそれらが存在する場合、畜牛の同一染色体（6番染色体）上のfat QTLとの連鎖（1頭の雄親の系統において）または連鎖不平衡（1つの母集団において）によると結論した。公開されたデータからの全体としての結論は、生乳中の脂肪総量は - カゼイン遺伝子型には関係しないこと、および - カゼインがヒトの健康に及ぼすかもしれない1つまたは複数の影響は、脂肪摂取総量には関係しないことである。しかし本出願人は今回、畜牛の6番染色体上の - カゼイン遺伝子の遺伝子型、およびメスウシの生乳の脂肪酸組成との間に、予想外の関連性を同定した。

【0018】

10

20

30

40

50

- カゼイン A¹を含有する生乳（A1生乳）は、 - カゼイン A¹を含有しない生乳（A2生乳）と比較して、脂肪の全体としての比率は類似するという先の所見を、本出願人は確認した。驚くことに、そして以前の所見とは矛盾して、A1生乳はA2生乳と比較して、より高い比率の飽和脂肪酸およびより低い比率の不飽和脂肪酸を有することを、本出願人は発見した。また驚くことには、C6、C8、C10、C12およびC14の脂肪酸のレベルが、 - カゼイン A²のホモ接合体のメスウシからの生乳では低減する、という所見が認められた。この有意な所見は、実質的に - カゼイン A¹を含まない生乳はまた、より低レベルの飽和脂肪酸および中鎖脂肪酸（C6からC14）、ならびにより高レベルの不飽和脂肪酸を有する乳脂肪をも產生することになることを示す。したがってこの生乳は、飽和脂肪酸の高摂取に伴う疾患のリスク、例えばアテローム硬化症、肥満、冠動脈心疾患、および糖尿病のリスクを低減する健康への有益性を有する。

【0019】

典型的にはメスウシはその生乳中に - カゼインを產生する。しかし A¹、A²、A³、B、C、D、E および F を含む、様々な - カゼイン変異型が存在する。これらのタンパク質間の差異は、 - カゼイン遺伝子中の配列の変異により決定される。例えば 1 つの差異は、A²、A³、D、E および F 変異型は 67 番の位置にプロリン残基を有するのに対し、A¹、B および C 変異型は 67 番の位置にヒスチジン残基を有することである。この差異は、 - カゼイン遺伝子をコードする領域の 200 番の位置での、ヌクレオチドアデニンのヌクレオチドシトシンによる置換により決定される。メスウシの - カゼイン変異型の表現型は、これらの変異型のタイプを識別する要因となる SNP の遺伝子型を決定することにより、間接的に決定することができる。

【0020】

- カゼイン変異型のタイプ、または - カゼイン遺伝子中の遺伝子の変異に基づいて動物を選択することで、その動物の生乳の脂肪酸の組成において有意な差異をもつ動物の群を同定することができることを、本出願人は発見した。例えば、 - カゼイン遺伝子をコードする領域の 200 番の位置がアデニンヌクレオチドのホモ接合体（A1）である動物からの生乳は、同位置がアデニンおよびシトシンのヌクレオチドのヘテロ接合体（A1/A2）である動物からの生乳とは脂肪酸の組成において異なり、そして同位置がシトシンのホモ接合体（A2）である動物からの生乳ともやはり異なる。

【0021】

より具体的には - カゼイン遺伝子の 200 番の位置のアデニンが、飽和脂肪酸 C6 : 0、C8 : 0、C10 : 0、C12 : 0 および C14 : 0 のレベルを増加させ、匹敵する量で不飽和脂肪酸 C18 : 1 を減少させる。集団、集団内の一群、血統、年齢 2 - 8+、搾乳状態の日数、メチル化群、および雄親の効果を考慮しない場合、 - カゼイン遺伝子型は、動物間のこれらの特異的な脂肪酸プロフィールにおける変化の 15 - 20 % の原因となる。

【0022】

- カゼインの 67 番の位置のヒスチジンの存在は、酵素による - カソモルフィン - 7 の形成を可能にする。 - カソモルフィン - 7 は、 - カゼイン A¹、B および C からのみ形成される 7 つのアミノ酸のペプチドである。カソモルフィンペプチドは、オピオイドとして作用することが知られている。Lin et al. (1998, Peptides 19(2): 325-31) によるデータは、 - カソモルフィン - 7 が食事からの脂肪の摂取を調節しているかもしれないことを示唆している。 - カソモルフィンがラットにおいて食餌の脂肪の摂取を刺激するのに対して、エンテロスタチンは摂取を阻害する。加えてチロシル末端残基を含むカゼイン加水分解物由来のペプチド（例えば - カソモルフィン - 7）は、ヒトの LDL（低密度リポタンパク質）のペルオキシダーゼ依存性の酸化を促進することが発見された。したがって - カゼイン A¹についての現在の理解は、ヒトの健康に有害な因子とのその関係という点でカゼインの作用に関し、そして、摂取したヒトの脂肪の代謝においてはカゼイン由来のペプチドの作用に関するが、異なる - カゼイン遺伝子型の動物からの生乳の脂肪組成における差異には触れていない。

10

20

30

40

50

【0023】

- カゼインが生乳の脂肪酸の組成に影響を及ぼすメカニズムは、遺伝子の連結によるものではないようである。というのは複数の雄親にわたって観察されたこの効果のサイズおよびコンシスタンシーのためである。本発明を何ら限定するものではないが、本発見は哺乳類の組織中の脂質の生体内合成における - カゼインの直接的な影響に関する、と推測される。あるいは本発見は、生乳中のカゼインの脂質との相互作用の直接的な結果であってもよい。後者が正しければ、製品の脂肪酸プロフィールを変えることが可能であってもよい。したがって規定の加工条件下の製品に、選択されたカゼイン変異型のタイプの動物から得られる - カゼイン（例えば - カゼイン A¹を含まない）を加えることで、その製品の脂肪酸プロフィールを有益に変えることにもなる。

10

【0024】

- カゼインに関する検査を使用して、搾乳用の集団に含める動物を選択することができる、または同検査を使用して、搾乳用の集団に含める動物の後代を育種する人工育種またはクローニングのための、雄親、雌親、もしくは組織のドナーとして使用する動物を選択することができる。このような方法で、その生乳のタンパク質分画に - カゼイン A¹ タンパク質を含まない（または唯一の - カゼインの存在が - カゼイン A² である）、そしてその生乳の脂肪分画において特定の飽和脂肪酸のレベルが低減し特定の不飽和脂肪酸のレベルが増加している生乳を、産生する搾乳用メスウシの集団を形成することができる。このような遺伝子型決定に基づいてメスウシを選択し、 - カゼイン A¹ 变異型を含まない、そして好ましくは - カゼイン A² 变異型のみを含む生乳を産生することになる搾乳集団を形成する方法は、PCT/NZ96/00039 (WO 96/36239として公開されている) の主題である。

20

【0025】

本発明の付加的な特徴は、一度特定の遺伝子型を持つ動物が選択されて、それから生乳が産生されれば、その生乳の出所、またはその他の製品、例えば粉乳および加工乳製品が、選択された動物から産生されているものとして証明することができる。このことは、このような乳製品の脂肪酸の組成を決定することにより達成することができる。消費者はしたがって、その生乳が本当に所望の遺伝子型の動物に由来することを確信することができる。

30

【0026】

本発明の生乳の利点は以下に多数挙げられる：

- (1) - カゼイン A¹ タンパク質が存在せず - カゼイン A² のみが存在することで、冠動脈心疾患および I 型糖尿病のリスクをより低下させる
- (2) 不飽和脂肪酸で飽和脂肪酸を置き換えることで、冠動脈心疾患、肥満およびその他の疾患のリスクをより低下させる
- (3) アテローム発生性であると考えられている C 14 : 0 の消費が低減する。

【0027】

カゼインが生乳の脂肪酸の組成に影響を与えるメカニズムは明らかではないが、それがカゼイン由来のカソモルフィンペプチドの形成を通して仲介される可能性はある。このことヒトによる - カゼイン A¹ の消費の影響との間にメカニズム的な関係があるかもしれない。しかし生乳の脂肪酸プロフィールへのカゼインの遺伝子型の直接的影響は、摂取したヒトの代謝におけるカゼインおよびカゼイン代謝物の直接的影響とは全く別の有用性を有する。 - カゼイン（または特定の変異型）が生乳の脂肪酸の組成を直接修飾し得る、直接的な影響もまたあるかもしれない。

40

【実施例】

【0028】

（実施例）

- カゼイン遺伝子の 200 番のヌクレオチドがヘテロ接合体の A / C である 6 頭の雄親に由来する、1114 頭の産子由来の生乳から DNA を抽出し、脂肪酸の組成を決定した。

50

【 0 0 2 9 】

D N A は以下の方法で生乳から抽出した。生乳は反転により完全に混合し、1 . 0 m l をピペットでとり、1 . 5 m l のマイクロ遠心チューブに入れた。このチューブを8 , 0 0 0 r p m で1 0 分間遠心し、上清（粗D N A を含む）の1 0 0 μ l アリコートを各サンプルからピペットでとり、新しい1 . 5 m l チューブに入れた。この粗D N A 抽出物は - 2 0 で凍結保存し、さらに精製せずに遺伝子型決定用として1 - 5 μ l を使用した。

【 0 0 3 0 】

使用した遺伝子型を決定する方法は、先にP C T / N Z 9 6 / 0 0 0 3 9 (W O 9 6 / 3 6 2 3 9 として公開されている) に詳細に記載されている。

脂肪酸分析用サンプルは1 5 , 0 0 0 r p m で1 5 分間遠心した。液体の上層のアリコートを各サンプルから取り出した。この脂質サンプルを6 0 . 0 まで加熱し、溶けた脂質を取り出して凍結保存した。その後サンプルをメチル化し、ガスクロマトグラフィーで分析した。クロマトグラフのピーク面積を積分して、各脂肪酸のレベルを定量した。各脂肪酸の同定は、各ピークの保持時間を公知の基準値と比較することにより決定した。

【 0 0 3 1 】

分析したサンプルから、2 0 0 番の位置がC C (A 2) 、A C (A 1 / A 2) 、またはA A (A 1) のいずれであるか動物の検査を行った。遺伝子型間の差異は、脂肪酸の組成に影響を与える可能性のあるその他の因子に関して生データを調整する、一般化線形モデルを使用して比較した。前もっての調整は以下の項目：集団、集団内的一群、血統、年齢2 - 8 + 、搾乳状態の日数、集団内のメチル化群について行った。最終的に雄親、遺伝子型、および遺伝子型による雄親との相互作用の項目をフィットさせた。

【 0 0 3 2 】

この研究から得られた結果を表1に提供し、そしてこの結果はA 2 遺伝子型が脂肪酸の組成に有意な影響を有していたことを示している。統計的有意性のレベルは個々の脂肪酸間で様々である (* = p < 0 . 0 5 、 ** = p < 0 . 1 、 *** = p < 0 . 0 0 1) 。 A 1 に比較して、A 2 遺伝子型を持つ動物からの生乳は、長鎖不飽和脂肪酸 (C 1 8 : 1) を有意により高い比率で、および (C 6 : 0 - C 1 4 : 0) の範囲の飽和中鎖脂肪酸をより低い比率で有していた；それに対してA 1 / A 2 の個体はこれらの値の中間の値であった。

【 0 0 3 3 】

C 1 8 : 1 の総計の比率として、A 2 由来の生乳はA 1 由来の生乳より約3 % 多いC 1 8 : 1 を有していた。C 1 8 : 1 は乳脂肪の約1 5 % を構成しており、したがって全体への影響は総乳脂肪の比率として、約0 . 5 % 多いC 1 8 : 1 となる。飽和脂肪酸の比率の低減は、不飽和脂肪酸の増加と類似していた。モデルにより集団、集団内的一群、血統、年齢2 - 8 + 、搾乳状態の日数、メチル化群、および雄親の影響を除外すると、 - カゼイン遺伝子型は、動物間のこれらの特異的な脂肪酸の組成における変化の1 5 - 2 0 % の原因となっていた。

【 0 0 3 4 】

【表1-1】

表1：乳脂肪中の%脂肪酸に関する β -カゼイン遺伝子型の分析のまとめ

Ruakura Genetics 試験におけるすべての動物を含む検討から得られた脂肪酸の特徴に関する残差（総脂肪酸の%として測定）
前もっての調整は以下について行った：集団、集団内的一群、血統、年齢2-8+、搾乳状態の日数、集団内のメチル化群。

	<u>C4:0</u>	<u>C6:0</u>	<u>C8:0</u>	<u>C10:0</u>	<u>C12:0</u>	<u>C14:0</u>
n=3760	<u>C4:0</u>	<u>C6:0</u>	<u>C8:0</u>	<u>C10:0</u>	<u>C12:0</u>	<u>C14:0</u>
平均(%)	2.67	2.24	1.56	3.79	4.31	12.63
残差(%)	0.29	0.19	0.12	0.42	0.52	0.81
adjR ²	0.44	0.48	0.47	0.40	0.40	0.24
モデル：雄親、 β -カゼイン遺伝子型 (A1; A1A2; A2)、遺伝子型×雄親の相互作用。特徴を標準化残差で表す。						
	<u>C4:0</u>	<u>C6:0</u>	<u>C8:0</u>	<u>C10:0</u>	<u>C12:0</u>	<u>C14:0</u>
n=1114						
雄親	**	*	**	***	***	***
遺伝子型	ns	*	**	**	*	**
遺伝子型 X 雄親	ns	ns	+	ns	ns	ns
対比 A2-A1	- 0	- 9	- 0	- 9	- 0	- 0
	(ns)	(**)	(**)	(**)	(*)	(*)
対比 A2-A1A2	- 9	- 9	- 9	- 9	- 9	- 9
	(ns)	(+)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)
対比 A1-A1A2	- 0.10±0.0 8	0.09±0.0 7	0.18±0.0 7	0.20±0.0 7	0.16±0.0 7	0.20±0.0 7
	(ns)	(ns)	(*)	(**)	(*)	(**)

【0035】

10

20

30

【表1-2】

表1 (続き)

Ruakura Genetics 試験におけるすべての動物を含む検討から得られた脂肪酸の特徴に関する残差 (総脂肪酸の%として測定)							
前もっての調整は以下について行った: 集団、集団内的一群、血統、年齢2-8+、搾乳状態の日数、集団内のメチル化群。							
<u>C15:0</u>	<u>C16:0</u>	<u>C16:1</u>	<u>C18:0</u>	<u>C18:1</u>	<u>C18:1</u> トランス	<u>C18:2</u>	<u>CLA</u>
1.36	30.48	1.33	9.45	15.69	3.48	1.36	0.84
0.16	2.71	0.29	1.37	1.85	0.87	0.20	0.27
0.26	0.22	0.26	0.28	0.27	0.34	0.60	0.36
モデル: 雄親、β-カゼイン遺伝子型 (A1; A1A2; A2)、遺伝子型 × 雄親 の相互作用。特徴を標準化残差で表す。							
<u>C15:0</u>	<u>C16:0</u>	<u>C16:1</u>	<u>C18:0</u>	<u>C18:1</u>	<u>C18:1</u> トランス	<u>C18:2</u>	<u>CLA</u>
***	***	***	***	***	***	***	***
ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
0.01±0. 10	- 0.07±0. 10	0.04±0. 10	0.01±0. 09	0.26±0. 10	0.08±0.1 0	0.09±0. 11	0.16±0. 10
(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(**)	(ns)	(ns)	(ns)
- 0.01±0. 09	- 0.09±0. 09	- 0.02±0. 09	0.09±0. 09	0.12±0. 09	0.07±0.1 0	0.001±0 .10	0.10±0. 09
(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)
- 0.02±0. 08	- 0.02±0. 08	- 0.06±0. 08	0.08±0. 07	- 0.14±0. 07	- 0.003±0. 08	- 0.09±0. 08	- 0.06±0. 08
(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(+)	(ns)	(ns)	(ns)

【0036】

本発明を実施例の方法により述べたが、本発明の範疇から離れず変更および修飾を行ってもよいことは、理解されなければならない。さらに特異的な特徴に対する公知の均等物があれば、このような均等物を本明細書に特異的に言及したものとして援用する。

【産業上の利用可能性】

【0037】

(産業上の利用可能性)

不飽和脂肪酸と比較して低レベルの飽和脂肪酸を有する生乳は、ある種の疾患および障害の回避に有用である。食事からの脂肪酸の摂取は、心疾患における主要なリスク因子であり、食事からの脂肪酸摂取の多くは生乳および乳製品の消費による。67番の位置にヒスチジンよりむしろプロリンを有する - カゼイン変異型を産生するメスウシの能力に基づいて、遺伝子型または表現型を決定したメスウシのみを搾乳することにより、不飽和脂

10

20

30

40

50

肪酸との関連において飽和脂肪酸が低レベルの生乳を得る能力は、ヒトの健康に有益な生乳を産生させる有用な方法を提示する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ03/00140																				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																						
Int. Cl. ⁷ : A01K 67/00, C07K 14/47, C12Q 1/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																						
B. FIELDS SEARCHED																						
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See electronic databases																						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See electronic databases																						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS CA MedLine Agricola. beta casein, polymorphism/allele/variant, milk, fat, saturated/unsaturated.																						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																						
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
A	WO 96/36239 A1 (Corran Norman Stuart McLachlan) 21 November 1996	1-12, 16																				
A	US 6451368 B1 (Robert B Elliott, and Jeremy P Hill) 17 September 2002	1-12, 16																				
A	Laugeson M and Elliott R. Ischaemic heart disease, type 1 diabetes and cow milk A1 β -casein. The New Zealand Medical Journal, Jan 2003. 116(1168):1-19	1-12, 16																				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex																				
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																			
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family																			
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																					
Date of the actual completion of the international search 19 August 2003	Date of mailing of the international search report 22 AUG 2003																					
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer Gillian Allen Telephone No : (02) 6283																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ03/00140
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	McLachlan CNS. β -casein A ¹ , ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. Medical Hypotheses, 2001. 56 (2): 262-272	1-12, 16
A	Bovenhuis H et al. Association between milk protein polymorphisms and milk production traits. J Dairy Science, 1992. 75 :2549-2559	1-12, 16
A	Ojala M et al. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. J Dairy Science, 1997. 80 : 1776-1785	1-12, 16
A	Ikonen T et al. Association between milk protein polymorphisms and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. J Dairy Science, 1999. 82 :1026-1033	1-12, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ03/00140
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet) <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos : 13-15 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: These claims are not limited to the technical features that define the invention. The invention is to a method of selecting and milking cows that have lower saturated/unsaturated fatty acid determined by their beta casein genotype. The invention extends to milk produced by the process. However, claims 13-15 are not limited to use of milk produced by the process defined by claim 1. 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a) 		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet) <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 		
Remark on Protest <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/NZ03/00140

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member
WO 96/36239	AU 55108/96, CA 2217820, EP 0871366
US 6451368	AU 39395/95, CA 2204245, EP 0789842 WO 9614577

END OF ANNEX

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA ,ZM,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100092886

弁理士 村上 清

(72)発明者 モーリス,クリストファー・アンソニー

ニュージーランド国ハミルトン,クーパー・プレース 5

(72)発明者 テイト,マイケル・ルイス

ニュージーランド国ドゥネディン,マックレア・ストリート 4

F ターム(参考) 4B001 DC01 EC05

4B018 LB07 MD09 MD10 MD11 MD12 MD13 MD20 MD71 ME04 ME14